

特集：有害センチュウ類の遺伝子診断技術

# 土壌から抽出したDNAを用いたPCR-RFLP法による ネコブセンチュウの検出

九州沖縄農業研究センター <sup>いわ</sup>岩 <sup>ほり</sup>堀 <sup>ひで</sup>英 <sup>あき</sup>晶

## はじめに

土壌からの有害線虫の分離には時間や熟練の技術を要し、線虫学実験特有の器材を必要とする。また、分離された線虫が有害であるかそうでないかを見分けて土壌中の密度を調べるには線虫形態学に関する知識および同定技術が必要であり、線虫の専門家以外にはなかなか手を出せない分野と言われている。しかしながら、圃場に生息する有害線虫の種や密度に関する情報はニーズが高く、調査の必要性を感じながらも先述のような線虫学に関する専門知識がないために調べるすべがなく、もどかしく感じておられる農業研究関係者は多いであろう。そこで本稿では、基礎的なDNA解析技術をもつ者であれば、線虫学に関する知識がなくとも、誰でも土壌中のネコブセンチュウを検出する手法を開発したので紹介する。

## I 土壌からの線虫分離法

土壌からの有害土壌線虫の検出にはいくつかの方法があるが、日本ではその簡便さから主にベルマン法が用いられている。ほかに篩い分け法、二層遠心分離法等があり、目的に応じて用いられている。これら手法の詳細については他(佐野, 2004)に譲る。日本で最も用いられているベルマン法は、20gあるいは30gの試料土壌(生土)から、2~3日間をかけて土壌線虫を分離する方法である。手軽で一度に多くの検体を処理できるが、抽出には時間がかかり、また、線虫の抽出効率も50%前後とされている。分離された線虫は顕微鏡下で観察し、口針をもった植物寄生性線虫か、口針をもたない細菌食性あるいは捕食性線虫かを見分け、カウンターを用いて計数し土壌中の密度を推定する。線虫の同定にはある程度の専門知識が必要であり、安定した結果を出すまでには習熟が必要である。このような作業手順を学ぶには土壌線虫の取り扱いについて専門家の研修を受ける

か、研究室の経験者から教えを受ける以外に、教科書を読んだだけで行うことは難しい。

一方、多くの生物同様、線虫学の分野においてもこの10年でDNAによる生物の同定技術法の開発が飛躍的に進み、また、インターネット上で誰もが手軽に知りたい生物のDNA塩基配列が入手できるようになった。極端なことを言えば、塩基配列さえわかれば、その線虫の形態や生理生態情報を知らなくてもある程度の種同定が可能となった。したがって、土壌からDNAを直接抽出し、調べたい線虫種(類)の特異的プライマーを用いてPCRを行い、PCR産物のRFLPあるいはシークエンシングを行うことによって得られた結果を既報あるいはインターネット上の情報と比較することにより、その種が土壌DNAに含まれていたかどうかを推定することができる。

土壌線虫は大きさや運動能力に様々な違いがあり、ベルマン法のように線虫の運動能力に依存した方法や、篩い分け法のように篩の目のサイズに制約される方法では抽出効率に種間差を生じやすい。土壌DNAを用いて有害線虫を検出する方法はこれらの問題点を解決し、土壌中で生きている線虫の真の個体数を反映するものであると考えられる。

## II 土壌からのDNA抽出

土壌からのDNA抽出は、まず土壌微生物学の分野で盛んに行われた。効率的な抽出は土壌微生物群集構造調査のためのPCR-DGGE解析(本誌19ページ参照)等に不可欠であるため、抽出法に工夫が重ねられ、現在数社から土壌DNA抽出キットが販売されるに至っている。筆者はこれらの中でも特に黒ボク土壌からのDNA抽出効率がよいとされるISOIL(ニッポンジーン)を利用していた。しかしながら、ISOILを使用するうち、メーカー推奨抽出手順(標準プロトコル)にDNA抽出効率向上のためによく用いられる処理をいくつか追加することによって、以下のように抽出効率が飛躍的に向上した。

### 1 超音波および後凍結処理の効果

まず標準プロトコル(図-1)を簡単に述べる。0.5g

Detection of Root-knot Nematodes by PCR-RFLP Method using Directly-extracted DNA from Soil. By Hideaki IWAHORI

(キーワード：土壌DNA, ネコブセンチュウ, ISOIL, PCR-RFLP法)

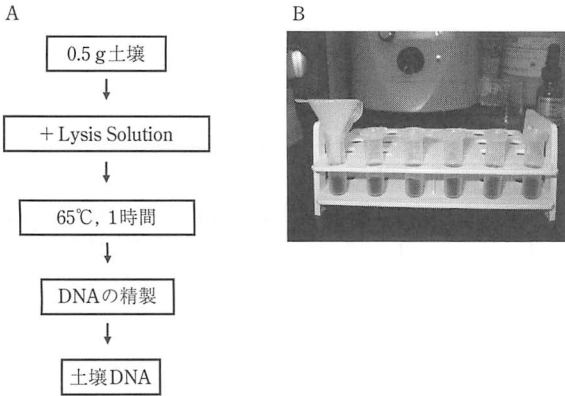


図-1 土壌 DNA 抽出の標準プロトコル  
A: 標準プロトコル B: 土壌をチューブに入れたところ。

の土壌サンプルを 2 ml チューブに入れ、ここへ 950  $\mu$ l の Lysis Solution HE と 50  $\mu$ l の Lysis Solution 20S を加え、よく混和する。次に、時々転倒混和しながら 65°C で 1 時間インキュベートする。これ以降は標準的な DNA の精製過程であり、クロロホルム-エタノール沈殿によって DNA を回収する。詳細についてはメーカー添付のプロトコルを参照されたい。

超音波処理は土壌の団粒構造を破壊し、線虫を含む全微生物を抽出溶液中に遊離拡散させる目的でよく行われる手法である。そこで、土壌サンプルに Lysis Solution を加えた段階で器具洗浄用の超音波装置 (SHARP, UT202S [発振器], UC202A [洗淨槽]) を用いて超音波 (28 kHz, 200 W) 1 分間および 3 分間の処理を行ったところ、DNA 収量は標準プロトコルに比して向上した (図-2)。また、65°C 1 時間のインキュベートの後に、-20°C 1 時間あるいは -80°C 15 分処理を行って凍結 (後凍結) させたところ、DNA 収量は超音波処理以上に向上した (図-2)。後凍結がなぜ収量の向上を導いたのかについては、細胞を凍結させ破壊し DNA を溶出させやすくすることなどが考えられ、経験的に有効であることが知られている。

超音波と後凍結処理の有効性が確認されたことから、これらの相乗効果について試験を行った。超音波処理を 15 秒、1 分、3 分、10 分、30 分行い、これらすべてについて後凍結処理を行った結果、超音波処理 3 分+後凍結処理で、標準プロトコルの約 10 倍の DNA 収量が得られた (図-3)。超音波処理は 3 分以上行っても DNA 収量は向上せず、また、長時間の超音波処理は DNA の物理的切断を引き起こし、さらには熱を発生させること

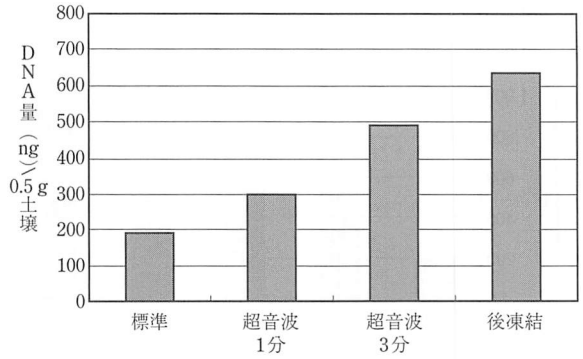


図-2 超音波または後凍結処理の効果

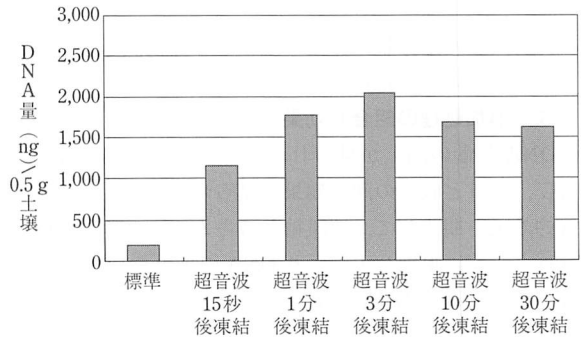


図-3 超音波と後凍結処理の相乗効果

から、処理はより短い時間が望ましいと考えられる。

## 2 前凍結, スキムミルク, および乾燥処理の効果

後凍結が DNA の抽出に有効であったことから、土壌サンプルに Lysis Solution を加える前の段階で -20°C 1 時間あるいは -80°C 15 分凍結処理 (前凍結) を行った。また、DNA の土壌への吸着を競合阻害させることが知られているスキムミルク 20 mg (検体土壌 0.5 g に対して 4%) を、同様に Lysis Solution 添加前に加えた。さらに、0.5 g 土壌中の DNA 濃度を高めることを目的として土壌の乾燥 (65°C 1 時間) を行った。これらの処理はそれぞれ後凍結との組合せで行った。その結果、前凍結処理は若干 DNA 収量の向上が見られたものの、スキムミルク添加処理には見られなかった (図-4)。前凍結は後凍結と同じ効果であるため、凍結の二度の処理はさほど追加の効果をもたらさなかったと考えられる。スキムミルク処理で向上効果が見られなかった理由については不明であるが、既に DNA が土壌に吸着されるのを防ぐような成分が Lysis Solution に含まれているのかも知れない。一方、乾燥処理は DNA 収量の大きな向上をもたらした (図-4)。これは乾燥そのものの効果と言うより

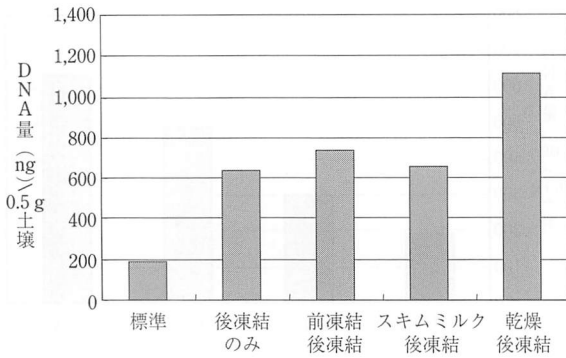


図-4 前凍結, スキムミルク, または乾燥と後凍結の相乗効果

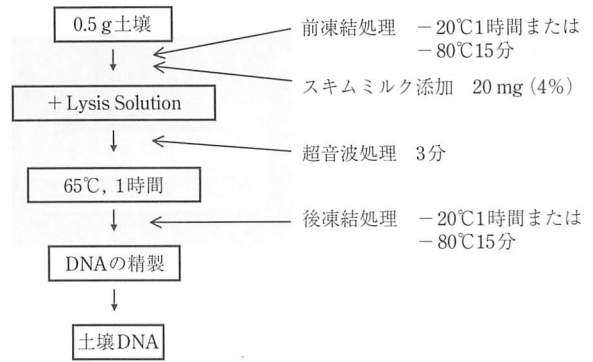


図-5 組合せ処理のプロトコル

は, 失われた水分量の分だけ土壌が多く供試されることにより収量の増加が見られたと考えられる。

### 3 追加処理の組合せ効果

DNA 収量の向上が見られた超音波と後凍結処理, および, さほど収量の向上効果は見られなかったものの相乗効果を期待して, 前凍結とスキムミルク処理を標準プロトコルに追加し土壌より DNA の抽出を行った (図-5)。乾燥処理は DNA 収量の向上をもたらしたが, その後の実験において PCR が不成功になる確率が高く, 抽出された DNA に乾燥によるなんらかの質の低下が生じたと考えられたことから採用しなかった。最もよいと考えられる追加処理の組合せを行った結果, 標準プロトコルによる DNA 抽出量が土壌 0.5 g より 189 ng であったのに対し, 組合せ処理では 2,981 ng となり, 約 16 倍の抽出効率の向上が見られた (図-6)。抽出効率は以下に述べる検出感度にも大きく影響すると考えられることから, さらなる抽出効率の向上が望まれる。

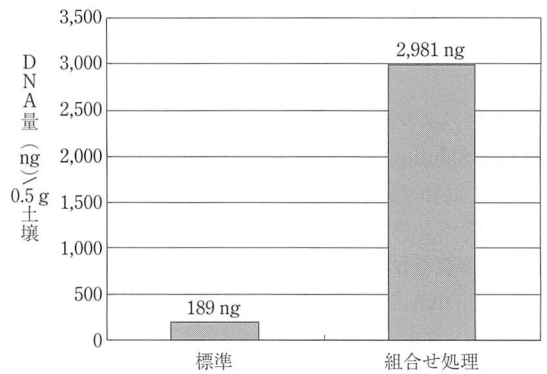


図-6 組合せ処理の効果

## III PCR-RFLP 法によるネコブセンチュウの検出

### 1 ネコブセンチュウの検出

土壌より抽出された DNA を鋳型として, PCR によるネコブセンチュウの検出を行った。供試土壌には 20 g 当たり約 400 頭 (ベルマン法による計数) のネコブセンチュウが生息していることがわかっている土壌を用いた。0.5 g の土壌より抽出された DNA を 50  $\mu$ l の蒸留水に溶かし, その 0.2  $\mu$ l を鋳型として PCR を行った。PCR の条件は HARRIS et al. (1990) に準じた (図-7)。プライマーはミトコンドリア DNA の一部を増幅させるものである。その結果, ネコブセンチュウにおいて期待される約 1.7 kb の PCR 産物が得られ (図-8 A), 制限酵素 *Hinf* I 処理によって得られた RFLP パターン (図-

反応液組成 ( $\mu$ l)	
鋳型 DNA	0.1
10 $\times$ 緩衝液	2.5
2.5 mM dNTP	2.0
10 $\mu$ M プライマー ( $\times$ 2)	1.0 ( $\times$ 2)
<i>Taq</i> DNA ポリメラーゼ	0.1
滅菌蒸留水	18.3
計	25.0

反応条件	
94 $^{\circ}$ C, 2分	} 40サイクル
94 $^{\circ}$ C, 1分	
50 $^{\circ}$ C, 2分	
68 $^{\circ}$ C, 3分	
72 $^{\circ}$ C, 5分	

プライマー (5'  $\rightarrow$  3')

Forward : TAAATCAATCTGTGTGAA  
Reverse : ATAAACCAGTATTTCAAAC

図-7 PCR の条件

8 B) より, この PCR 産物がネコブセンチュウ DNA に由来するものであると判断できた。したがって, 土壌から抽出した DNA には, ネコブセンチュウ以外の線虫は

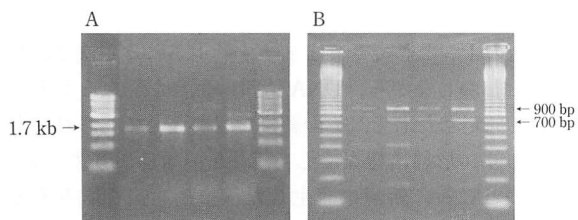


図-8 土壌より抽出された DNA を鋳型とした PCR  
A: PCR の結果 B: *Hind*III 処理後の PCR 産物.

もとより細菌や糸状菌等様々な土壌微生物の DNA が混入しているが、本手法によりネコブセンチュウの DNA のみを検出することができた。

### 2 PCR の諸条件

いくつか注意すべき PCR の条件として、まず、鋳型として用いる DNA の量は、0.5 g の土壌より抽出された DNA を 50  $\mu$ l の蒸留水に溶かしたうちの 0.1 ~ 0.2  $\mu$ l が最適であり、これより多くても少なくとも結果は思わしくなかった。また、PCR に用いる *Taq* DNA ポリメラーゼは、TaKaRa ExTaq (タカラバイオ) 等の高感度増幅能をもつものを使用することが必要である。

プライマーに関して、HARRIS et al. (1990) のプライマーは西南暖地に最も普通に生息するサツマイモネコブセンチュウとアレナリアネコブセンチュウに対しては有効であるが、冷涼な地域において普通種であるキタネコブセンチュウに対しては PCR による増幅が見られないため利用することができない。キタネコブセンチュウの生息が予測される土壌に対しては、POWERS and HARRIS (1992) のプライマーを使用し、ORUI (1998) の手法によって当該種を識別する必要がある。西日本に広く分布し、最重要種の 1 つとされているミナミネグサレセンチュウに対しては、種特異的検出プライマーが開発されている (UEHARA et al., 1998) のでこれを利用する。

### 3 検出感度

本手法によるネコブセンチュウの検出感度を明らかにするため、土壌 20 g 当たり約 10, 100, 1,000, 10,000 頭 (ベルマン法による計数) のネコブセンチュウが生息する土壌を供試し、それぞれから DNA を抽出し、これらを鋳型として PCR を行った。その結果、20 g 当たり約 100 頭の線虫密度でネコブセンチュウの検出が可能であった (図-9)。この検出感度は ATKINS et al. (2005) による、土壌から抽出した DNA から *Nacobbus* 属線虫を検出できた感度 (20 g 当たり 600 頭) を上回る結果であった。しかしながら、検出感度は PCR の対象とする DNA の領域によっても異なるため、土壌からの DNA

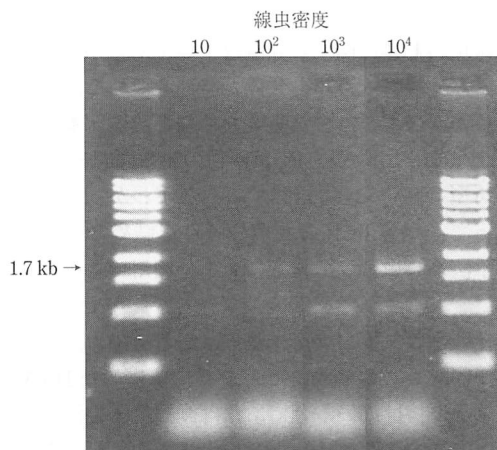


図-9 土壌より抽出された DNA を鋳型とした PCR

抽出効率と検出感度の相関は対象線虫と対象 DNA 領域で実際に試行してみる必要がある。

## IV 問題点と今後の展望

本手法で検出できた土壌 20 g 当たり約 100 頭の線虫密度は、実際にはかなり高い密度であり、作物の生育期後半における検出には有効であるが、生育初期あるいは作付け前の土壌診断として利用するには検出感度が不足している。しかしながら、20 g 当たり 100 頭という密度は、供試する土壌 0.5 g 中にネコブセンチュウが 2.5 頭という密度であり、土壌中における線虫の分布が極めて不均一であることを考えると、検出のための供試土壌 0.5 g には偶発的に 1 頭も含まれないこともあり得る。すなわち、検出感度は土壌 DNA 抽出キットに用いる供試試料の量による制約によるところが大きく、このままではさらなる感度の向上は望めないであろう。実用レベルでは少なくとも確実に 20 g 当たり 10 頭を検出できる手法が求められることから、なんらかの対策が必要となる。

1 つの方法としては供試試料のスケールアップがあり、10 倍の土壌を一度に供試することができれば感度は理論上 10 倍となる。しかしこれにはコストも 10 倍になるデメリットがある。他の方法としては土壌中の線虫をなんらかの方法で濃縮することである。その 1 つとして、手間はかかるがベルマン法を用いて土壌より線虫を抽出し (ここには種々様々な種類の線虫が含まれる)、分離された線虫を対象にネコブセンチュウのみの検出を行う方法が考えられる。試みに筆者が行ってみたところ、ほぼ確実に 20 g 当たり 10 頭のネコブセンチュウ密

度の土壌でネコブセンチュウのみを検出できた。この方法は線虫の形態に関する知識は不要であるが、ベルマン法により分離するための装置と時間を要する。

線虫密度の推定もまた必要な情報となる。本実験では明瞭ではなかったが、PCR産物の生成量は一定の条件下で鋳型DNAの量に相関することがわかっている。したがって、定量PCRのための条件を詰めることによって本手法は線虫密度の推定にも十分利用できると考えている。

現在のところ検出感度に難点はあるものの、線虫学の知識や器材を必要とすることなく、基礎的なDNA解析手法を身につけている者であれば誰でも本手法によって土壌中のネコブセンチュウを検出することができる。また検出したい対象線虫に応じてプライマーや制限酵素を変えることでネグサレセンチュウやシストセンチュウといった他の有害線虫の検出も可能と考えられ、さらには他の土壌微生物にも応用することが可能な技術になることが期待される。

## おわりに

これまで記してきたように、本手法は線虫学者でなく

とも土壌中の有害線虫を検出できる方法であり、土壌検診技術の1つとして今後ますます利用される手法と思われる。しかしながら、DNA情報は生きた線虫を形態によって同定した上で、その線虫を材料として得られたものであり、形態情報なくしてDNA情報はあり得ない。実際のところ、新規に発生した線虫の検出を試みるときに、その線虫が新種だったり、既知ではあるが研究されておらずDNA情報が公開されていない種であった場合には、本手法は即座には役に立たない。このようなことから、基礎は決しておろそかにすべきではなく、線虫学における形態学的研究についてもますます並行して進めていく必要がある。

## 引用文献

- 1) ATKINS, S. D. et al. (2005): *Nematology* 7: 193 ~ 202.
- 2) HARRIS, T. S. et al. (1990): *J. Nematol.* 22: 518 ~ 524.
- 3) ORUI, Y. (1998): *Appl. Entomol. Zool.* 31: 505 ~ 514.
- 4) POWERS, T. O. and T. S. HARRIS (1993): *J. Nematol.* 25: 1 ~ 6.
- 5) 佐野善一 (2004): 線虫学実験法, 日本線虫学会, つくば, p. 86 ~ 92.
- 6) UEHARA, T. et al. (1998): *Nematologica* 44: 357 ~ 368.

(新しく登録された農薬4ページからの続き)

### ● DCIP・D-Dくん蒸剤

22251: プラズマ油剤 (エス・ディー・エス バイオテック)  
08/09/10

DCIP: 41.0%, D-D: 55.5%

かんしょ: ネコブセンチュウ: 植付の10~15日前

トマト: ネコブセンチュウ: 定植の10~15日前

ミニトマト: ネコブセンチュウ: 定植の10~15日前

きゅうり: ネコブセンチュウ: 定植の10~15日前

すいか: ネコブセンチュウ: 定植の10~15日前

なす: ネコブセンチュウ: 定植の10~15日前

ピーマン: ネコブセンチュウ: 定植の20日前

メロン: ネコブセンチュウ: 定植の20日前

いちご: ネグサレセンチュウ: 定植の10~15日前

きく: ネグサレセンチュウ: 定植の10~15日前

### 「殺虫・殺菌剤」

#### ● クロチアニジン・トリシクラゾール・フェリムズン水和剤

22257: ノンプラスダントツフロアブル (協友アグリ)  
08/09/24

22258: プラステクトダントツフロアブル (住友化学)  
08/09/24

クロチアニジン: 6.6%, トリシクラゾール: 8.0%, フェリムズン: 15.0%

稲: いもち病, ウンカ類, カメムシ類: 収穫21日前まで (空中散布)

稲: いもち病, ウンカ類, カメムシ類: 収穫21日前まで

(無人ヘリコプター)

### 「除草剤」

#### ● ピラクロニル・ピラゾスルフロンエチル・ブタクロール・ベンゾビシクロン粒剤

22237: ハーディ1キログラム (日産化学工業) 08/09/10

ピラクロニル: 2.0%, ピラゾスルフロンエチル: 0.30%, ブタクロール: 7.5%, ベンゾビシクロン: 2.0%

移植水稻: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ (北海道を除く), ヘラオモダカ (北海道, 東北), ヒルムシロ, セリ (北陸を除く), アオミドロ・藻類による表層はく離

#### ● クロメプロップ・フェントラザミド・ベンスルフロンメチル水和剤

22238: ホクコーロングキックLフロアブル (北興化学工業)  
08/09/10

22239: ロングキックLフロアブル (デュボン) 08/09/10

クロメプロップ: 9.0%, フェントラザミド: 6.0%, ベンスルフロンメチル: 1.0%

移植水稻: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ, ヒルムシロ, セリ

#### ● クロメプロップ・フェントラザミド・ベンスルフロンメチル水和剤

22240: ホクコーロングキックフロアブル (北興化学工業)  
08/09/10

(18ページに続く)